



**PCT**  
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro  
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>C12Q 1/68, C12N 15/70</b></p>	<b>A1</b>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 99/25869</b></p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 27. Mai 1999 (27.05.99)</p>		
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top; border: none;"> <p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/07397</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 18. November 1998 (18.11.98)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 197 51 242.9 19. November 1997 (19.11.97) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): PHARMA-ZENTRALE GMBH [DE/DE]; Loerfeld- strasse 20, D-58313 Herdecke (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MALINKA, Jürgen [DE/DE]; Paulswiese 11, D-59379 Selm (DE). HACKER, Jörg [DE/DE]; Edith-Stein-Strasse 6, D-97218 Gerbrunn (DE). BLUM-OEHLER, Gabriele [DE/DE]; Goethes- trasse 3, D-97072 Würzburg (DE). SONNENBORN, Ulrich [DE/DE]; Eichenweg 6, D-44799 Bochum (DE). SCHULZE, Jürgen [DE/DE]; Alice-Bloch-Strasse 7, D-14558 Bergholz-Rehbrücke (DE). PROPPERT, Hans [DE/DE]; Rosenstrasse 102, D-58095 Hagen (DE).</p> <p>(74) Anwalt: HARMSSEN &amp; UTESCHER; Adenauerallee 28, D-20097 Hamburg (DE).</p> </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top; border: none;"> <p>(81) Bestimmungsstaaten: CZ, EE, HU, JP, LT, LV, NO, PL, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p><b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p> </td> </tr> </table>			<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/07397</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 18. November 1998 (18.11.98)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 197 51 242.9 19. November 1997 (19.11.97) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): PHARMA-ZENTRALE GMBH [DE/DE]; Loerfeld- strasse 20, D-58313 Herdecke (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MALINKA, Jürgen [DE/DE]; Paulswiese 11, D-59379 Selm (DE). HACKER, Jörg [DE/DE]; Edith-Stein-Strasse 6, D-97218 Gerbrunn (DE). BLUM-OEHLER, Gabriele [DE/DE]; Goethes- trasse 3, D-97072 Würzburg (DE). SONNENBORN, Ulrich [DE/DE]; Eichenweg 6, D-44799 Bochum (DE). SCHULZE, Jürgen [DE/DE]; Alice-Bloch-Strasse 7, D-14558 Bergholz-Rehbrücke (DE). PROPPERT, Hans [DE/DE]; Rosenstrasse 102, D-58095 Hagen (DE).</p> <p>(74) Anwalt: HARMSSEN &amp; UTESCHER; Adenauerallee 28, D-20097 Hamburg (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: CZ, EE, HU, JP, LT, LV, NO, PL, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p><b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/07397</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 18. November 1998 (18.11.98)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 197 51 242.9 19. November 1997 (19.11.97) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): PHARMA-ZENTRALE GMBH [DE/DE]; Loerfeld- strasse 20, D-58313 Herdecke (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MALINKA, Jürgen [DE/DE]; Paulswiese 11, D-59379 Selm (DE). HACKER, Jörg [DE/DE]; Edith-Stein-Strasse 6, D-97218 Gerbrunn (DE). BLUM-OEHLER, Gabriele [DE/DE]; Goethes- trasse 3, D-97072 Würzburg (DE). SONNENBORN, Ulrich [DE/DE]; Eichenweg 6, D-44799 Bochum (DE). SCHULZE, Jürgen [DE/DE]; Alice-Bloch-Strasse 7, D-14558 Bergholz-Rehbrücke (DE). PROPPERT, Hans [DE/DE]; Rosenstrasse 102, D-58095 Hagen (DE).</p> <p>(74) Anwalt: HARMSSEN &amp; UTESCHER; Adenauerallee 28, D-20097 Hamburg (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: CZ, EE, HU, JP, LT, LV, NO, PL, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p><b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>			
<p>(54) Title: DNA SEQUENCES OF GENES FROM FIMBRIAE D'ESCHERICHIA COLI STRAIN DSM 6601</p> <p>(54) Bezeichnung: DNA-SEQUENZEN AUS FIMBRIENGENEN DES ESCHERICHIA COLI-STAMMS DSM 6601</p> <p>(57) Abstract</p> <p style="padding-left: 40px;">The invention relates to DNA sequences with nucleotide sequences represented in figures 1 and 2, and to the use thereof.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p style="padding-left: 40px;">Die Erfindung betrifft DNA-Sequenzen mit den in den Abbildungen 1 und 2 dargestellten Nukleotidfolgen und deren Verwendung.</p>				

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

## DNA-SEQUENZEN AUS FIMBRIENGENEN DES ESCHERICHIA COLI-STAMMS DSM 6601

Die Erfindung betrifft DNA-Sequenzen aus den Fimbriengenclustern von Escherichia coli Stamm DSM 6601.

5 Escherichia coli ist ein gramnegatives Bakterium, das in der menschlichen und tierischen Darmflora, aber auch extraintestinal vorkommt. E. coli tritt in zahlreichen Varianten auf, die sich hinsichtlich der Kapselantigene, Oberflächenantigene und Flagellenantigene unterscheiden und daher in zahl-  
10 reiche serologische Typen unterteilt werden können. Die Einordnung nach den Serotypen läßt allerdings keine Aussage über die unterschiedliche Virulenz der Keime zu. Vertreter ein- und desselben Serotyps können sowohl im menschlichen als auch im tierischen Körper ein unterschiedliches Pathogenitätspotential besitzen, das im Extremfall von avirulent bis hochgradig patho-  
15 gen reichen kann. Der E.-coli-Stamm DSM 6601 gehört zu der Serogruppe O6:K5 und wird als nicht human- oder tierpathogen bewertet.

Dieser Stamm besitzt zwei chromosomal kodierte Fimbriengencuster, nämlich ein Typ I (*fim*)- bzw. F1C (*foc*)-Gencluster. Es ist bekannt, daß die Fim-  
20 brien dieses Stammes ein Adhäsine tragen. Adhäsine sind Strukturen, die bei der Anheftung des bakteriellen Organismus an andere Zellen eine wichtige Rolle spielen.

Fimbriengene finden hauptsächlich Anwendung in der Analytik und  
25 Diagnostik. Anwendungsmöglichkeiten sind aber auch in der Medizin und Ernährungsphysiologie bzw. in der Biotechnik gegeben.

-2-

Fimbriengene bzw. deren Hauptuntereinheiten können so z.B. zur Charakterisierung eines bestimmten Stammes herangezogen werden, so daß ein Bedarf nach weiteren Untersuchungen über die Sequenz dieser Gene gegeben ist.

5

Erfindungsgemäß wurden jetzt Untersuchungen mit dem E.-coli-Stamm DSM 6601 durchgeführt und die enthaltenen DNA-Sequenzen der Fimbrienhauptuntereinheiten *fimA* (Abb. 1) und *focA* (Abb. 2) genauer analysiert. Die von dem Stamm erhaltenen DNA-Sequenzen wurden mit Hilfe von  
10 Datenbankprogrammen einer DNA-Sequenzanalyse unterzogen und mit den DNA-Sequenzen bekannter Stämme verglichen. Während bei den Hauptuntereinheiten *focA* des Stammes DSM 6601 im Vergleich zum Stamm AD 110 Abweichungen an einer Stelle der DNA-Sequenz festzustellen waren, sind in der DNA-Sequenz des *fimA*-Gens des Stammes DSM 6601  
15 zum Vergleichsstamm HB 101 Abweichungen an mehreren Stellen zu finden, wie Abb. 1 und 2 zeigen:

Zur Analyse der beiden Fimbrienhauptuntereinheiten *fimA* und *focA* des Stammes DSM 6601 - und der Vergleichsstämme AD 110 und HB 101 -  
20 wurden die entsprechenden DNA-Fragmente zunächst mit Hilfe von PCR-Reaktionen aus dem Chromosom der Stämme angereichert.

Die Erfindung wird nunmehr anhand der Beispiele näher erläutert:

25 Beispiel 1:

Anreicherung des *fimA*-Gens aus den Stämmen DSM 6601 und HB 101

-3-

Folgende Primerpaare wurden für diese PCR-Reaktion verwendet:

fimA1: 5' -GTG TAC AGA ACG ACT GCC-3'

fimA2: 5' -GTA ATG ACG TCC CTG AAC-3'

- 5 Bedingungen für die PCR:      Schritt 1: 3 min bei 95° C denaturieren  
   Schritt 2: 45 sec 95° C  
   Schritt 3: 45 sec 53° C  
   Schritt 4: 45 sec 72° C  
   Schritt 5: 5 min bei 72° C

10

Die Schritte 2 - 4 wurden 30mal wiederholt.

Beispiel 2:

Anreicherung des *focA*-Gens aus den Stämmen DSM 6601 und AD 110

15

Folgende Primerpaare wurden für diese PCR-Reaktion verwendet:

focA1: 5' -CTC ACA TTG CAT TTA TGA AG-3'

focA2: 5'-GGT ATA TAT CCG TTA CAC TG-3'

- 20 Bedingungen für die PCR:      Schritt1: 3 min bei 95° C denaturieren  
   Schritt 2: 45 sec 95° C  
   Schritt 3: 45 sec 51° C  
   Schritt 4: 45 sec 72° C  
   Schritt 5: 5 min bei 72° C

25

Die Schritte 2 - 4 wurden 30mal wiederholt.

Beispiel 3:

## Klonierung und Plasmidisolierung

Die in Beispiel 1 und 2 erhaltenen PCR-Produkte werden in Anlehnung an  
5 das Verfahren von Sambrook et al. (Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis,  
T., *Molecular Cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory,  
second edition (1989), Cloning, Transformation: 1.53 - 1.84; PCR: 14.00 -  
14.35) in den Vektor pUC 18 kloniert und die resultierende Plasmid-DNA in  
den E.-coli-K12-Stamm DH5 $\alpha$  transformiert.

10

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgt in Anlehnung an das Verfahren von  
Birnboim et al. (Birnboim, A.C. and Doly, J. (1979) Nucl. Acids Res. 7:1513-  
1523. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant  
plasmid DNA).

15

3 ml LB-Medium werden mit einer Bakterienkolonie beimpft und über Nacht  
bei 37° C geschüttelt. Diese Kultur wird in einem Eppendorfgefäß abzentrifugiert,  
der Medienrückstand wird mit einer Pipette entfernt. Das Zellsedi-  
ment wird mit 100  $\mu$ l Lösung I (50 mM Glukose; 10 mM EDTA, pH 8; 25  
20 mM Tris-HCl, pH 8) resuspendiert. Nach 5 min Inkubation bei Raumtempe-  
ratur gibt man 200  $\mu$ l Lösung II (0,2 N NaOH; 1 % SDS) dazu, mischt bis  
zum Aufklaren und läßt das Eppendorfgefäß weitere 5 min auf Eis stehen.  
Dann fügt man 150  $\mu$ l Lösung III (3 M Na-Acetat, pH 4,8) hinzu, schüttelt  
kurz bis die chromosomale DNA flockig ausfällt und beläßt den Ansatz  
25 nochmals 5 min auf Eis. Die ausgefällte chromosomale DNA und die  
Zellreste werden 5 min in der Zentrifuge pelletiert und der Überstand mit der  
Plasmid-DNA wird in ein neues Gefäß überführt. Zur Reinigung der Plasmid-

-5-

DNA werden 50  $\mu$ l Phenol und 150  $\mu$ l Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugegeben und nach kurzem Schütteln 2 min abzentrifugiert. Die wäßrige Phase wird in ein neues Gefäß pipettiert. Die Plasmid-DNA wird mit 2 Volumina eiskaltem Ethanol ausgefällt und 10 min abzentrifugiert. Das Pellet wird mit 70 % Ethanol gewaschen und in der Speedvac getrocknet. Die Plasmid-DNA wird in 20  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> resuspendiert und bei -20°C aufbewahrt.

#### Beispiel 4:

#### 10 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte in Anlehnung an das Verfahren von Sanger et al. (Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467. DNA sequencing with chain terminating inhibitors).

15

Die DNA-Sequenzierung erfolgte mit dem T7-Sequenzier-Kit der Firma Pharmacia-LKB.

Für den Denaturierungsschritt werden 8  $\mu$ l (1,5 bis 2  $\mu$ g) Plasmid-DNA mit 2  $\mu$ l 2 N NaOH gemischt, kurz abzentrifugiert und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die DNA wird mit 3  $\mu$ l 3 M Na-Acetat, pH 4,8 sowie 7  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> und 60  $\mu$ l eiskaltem Ethanol<sub>absolut</sub> 15 min bei -70°C gefällt. Die gefällte DNA wird 10 min abzentrifugiert, mit 70 % Ethanol gewaschen und getrocknet.

25

Für die Annealing-Reaktion wird die denaturierte DNA in 10  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> suspendiert und mit 2  $\mu$ l Annealing-Puffer und 2  $\mu$ l Primer (40 ng) ge-

-6-

mischt. Der Ansatz wird 20 min bei 37° C inkubiert, so daß eine Bindung des Primers an die Template-DNA erfolgen kann. Der Reaktionsansatz wird 10 min bei Raumtemperatur abgekühlt und dann entweder sofort für die Labelling-Reaktion verwendet oder bei -20° C eingefroren.

5 Für die Labelling-Reaktion werden 3 µl Labelling-Mix, 1 µl [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP und 2 µl T7-Polymerase (die T7-Polymerase wurde 1:5 mit Enzymverdünnungspuffer verdünnt) in den Annealing-Reaktionsansatz einpipettiert und nach kurzem Mischen 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen werden die für die Terminationsreaktion bereits vorbereiteten Sequenziermische (je 1 Gefäß mit 2,5 µl 'G', 'A', 'T' und 'C'-Mix „short“) bei 37° C vorgewärmt. Nach Ablauf der Labelling-Reaktion werden jeweils 4 µl davon zu den vier Sequenziermischen zugegeben und kurz mit der Pipette gemischt. Die Terminationsreaktionen werden 5 min bei 37° C inkubiert. Zum Beenden der Terminationsreaktionen werden

15 je 5 µl Stop-Lösung zugegeben. Die Ansätze werden nun in einen Inkubator mit 95° C überführt, 2 min denaturiert und dann auf Eis gestellt. Je 2,5 µl der Reaktionen werden auf ein Sequenziergel [25,2 g Harnstoff, 22 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>, 6 ml 10x TBE, 10 ml Polyacrylamid (40 %), 2 ml Ammoniumpersulfat (16 mg/ml), 60 µl TEMED] in der Reihenfolge 'G', 'A', 'T', 'C' aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei 40 Watt und

20 1500 Volt für 4,5 h.

Diese DNA-Sequenzen können auch in an sich bekannter Weise synthetisch

25 hergestellt und bestimmte Sequenzabschnitte als Primer verwendet werden, womit dann eine Identifizierung von E.-coli-Stamm DSM 6601 einwandfrei ermöglicht wird. Es besteht aber auch die Möglichkeit, die entsprechenden



-7-

DNA-Sequenzen dieses Stammes gentechnologisch in andere E.-coli-Stämme einzubringen, um damit z.B. das Verhalten bei der Anheftung der Zellen zu modifizieren und damit die Kolonisationseigenschaften anderer Stämme zu beeinflussen.

## SEQUENZPROTOKOLL

## ALLGEMEINE ANGABEN

ANMELDER:

PHARMA-ZENTRALE GMBH  
LOERFELDSTRASSE 20  
58313 HERDECKE  
BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

BEZEICHNUNG DER  
ERFINDUNG:

DNA-SEQUENZEN AUS FIMBRIENGENEN VON  
ESCHERICHIA COLI STAMM DSM 6601

ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

## COMPUTERLESBARE FASSUNG:

DATENTRÄGER  
COMPUTER  
BETRIEBSSYSTEM  
SOFTWARE

DISKETTE  
IBM COMPATIBEL  
WINDOWS 95  
MICROSOFT WORD 6.0

## DATEN DER JETZIGEN ANMELDUNG

ANMELDENUMMER  
ANMELDETAG

-  
-

## ANGABEN ZUM VERTRETER

NAME  
VERTRETERNUMMER  
AKTENZEICHEN  
TELEFON  
TELEFAX

DRES. HARMSSEN & UTESCHER  
268569  
PT 19/97  
040-249757  
040-2803672

ANGABEN ZU SEQ ID NO:

fimadsm

## SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

LÄNGE  
ART  
STRANGFORM  
TOPOLOGIE

549 BASENPAARE  
DNA  
DOPPELSTRANG  
LINEAR

## URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

ORGANISMUS  
STAMM  
ZELLTYP

ESCHERICHIA COLI  
DSM 6601  
EINZELLIGER ORGANISMUS

## ANGABEN ZU PUBLIKATIONEN:

AUTOREN  
TITEL  
ZEITSCHRIFT

KLEMM, P.  
The fimA gene encoding the type 1 fimbrial subunit of  
Escherichia coli  
EUR. J., BIOCHEM.

BAND  
SEITEN  
DATUM

143 (2)  
395-399  
1984

SEQUENZBESCHREIBUNG

SEQ ID NO: fimadsm

1 ATGAAAATTA AAACCTCTGGC AATCGTTGCT CTGTCGGCTC TGTCCCTCAG  
51 TTCCGCAGCG GCTCTGGCCG ATACTACGAC GGTAATGGT GGGGCCGTTC  
101 ACTTTAAAGG GGAAGTTGTT AACGCCGCTT GCGCAGTTGA TGCAGGCTCT  
151 GTTGATCAAA CCGTTCAGTT AGGCCAGGTT CGTACCGCTA GCCTGAAGCA  
201 GGAAGGAGCA ACCAGCTCTG CCGTTGGTTT TAACATTCAG GTGAATGATT  
251 GCGATACCAC TGTTGCCACA AAAGCTGCTG TTGCCTTCTT AGGTACGGCA  
301 ATTGATGCTA CCGATACTGA TGTACTGGCT CTGCAGAGTT CAGCTGCGGG  
351 TAGCGCAACA AACGTTGGTG TGCAGATCCT GGACAGAACG GGTGCTGCGC  
401 TGACGCTGGA CGGTGCGACA TTTAGTTCAG AAACAACCCT GAATAACGGA  
451 ACCAATACCA TTCCGTTCCA GGCGCGTTAT TTTGCAACCG GTGCCGCAAC  
501 CCCGGGTGCT GCTAATGCGG ATGCGACCTT CAAGGTTTCA TATCAATAA

**SEQUENZPROTOKOLL****ALLGEMEINE ANGABEN****ANMELDER:**

PHARMA-ZENTRALE GMBH  
LOERFELDSTRASSE 20  
58313 HERDECKE  
BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

**BEZEICHNUNG DER  
ERFINDUNG:**

DNA-SEQUENZEN AUS FIMBRIENGEBENEN VON  
ESCHERICHIA COLI STAMM DSM 6601

ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

**COMPUTERLESBARE FASSUNG:**

DATENTRÄGER  
COMPUTER  
BETRIEBSSYSTEM  
SOFTWARE

DISKETTE  
IBM COMPATIBEL  
WINDOWS 95  
MICROSOFT WORD 6.0

**DATEN DER JETZIGEN ANMELDUNG**

ANMELDENUMMER  
ANMELDETAG

-  
-

**ANGABEN ZUM VERTRETER**

NAME  
VERTRETERNUMMER  
AKTENZEICHEN  
TELEFON  
TELEFAX

DRES. HARMSSEN & UTESCHER  
268569  
PT 19/97  
040-249757  
040-2803672

**ANGABEN ZU SEQ ID NO:**

focadsm

**SEQUENZCHARAKTERISTIKA**

LÄNGE  
ART  
STRANGFORM  
TOPOLOGIE

543 BASENPAARE  
DNA  
DOPPELSTRANG  
LINEAR

**URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:**

ORGANISMUS  
STAMM  
ZELLTYP

ESCHERICHIA COLI  
DSM 6601  
EINZELLIGER ORGANISMUS

**SEQUENZBESCHREIBUNG**

SEQ ID NO: focadsm

1 atgaagttaa aattcatctc catggctgta ttttcagctc tgaccctggg  
51 tgttgcgaca aatgcgtctg ctgtcaccac ggtaggtgt ggtacagttc  
101 attttaaggg tgaagtgggt aatgctgcat gtgctgtaaa cactaactca  
151 ttcgatcaga cggttaatct tggacagggt cgttccgaaa gattgaaagt  
201 agatggagct aaaagcaatc cagttggatt tacaattgaa ttaaattgatt  
251 gtgactcgca ggtgtctgct ggtgcaggaa ttgtcttttc aggccagca  
301 gttactggta aaacagatgt tcttgcttta caaagttctg cagcgggttc  
351 tgcaacaaac ttcggcgctc agattactga ccataggccg aaggttgtac  
401 ctttagatgg aactgcaagc tcaacgttta cattaactga cggaaccaac  
451 aaaattccat ttcaggcgggt ttactacgca actggacagg ccactgctgg  
501 tattgccaac gccgacgcca cttttaaggt tcagtaccag taa

**Patentansprüche**

1. DNA-Sequenzen mit oder aus der in Abbildung 1 dargestellten Nukleotidfolge.  
5
2. DNA-Sequenzen mit oder aus der in Abbildung 2 dargestellten Nukleotidfolge.
3. Verwendung der DNA-Sequenzen nach Anspruch 1 oder 2 in der  
10 mikrobiologischen Analytik und/oder Diagnostik.
4. Verwendung der DNA-Sequenzen nach Anspruch 1 oder 2 zu medizinischen und/oder ernährungsphysiologischen bzw. probiotischen Zwecken.  
15
5. Verwendung der DNA-Sequenzen nach Anspruch 1 oder 2 in der Biotechnik, insbesondere als Expressionsvektoren.

DSM 1 .....ATGA 4  
6601 ||||  
HB101 551 GACTGCCCATGTCGATTTAGAAATAGTTTTTTGAAAGGAAAGCAGCATGA 600  
  
5 AAATTAAAACTCTGGCAATCGTTGCTCTGTCTGGCTCTGTCCCTCAGTTCC 54  
|||||  
601 AAATTAAAACTCTGGCAATCGTTGTTCTGTCTGGCTCTGTCCCTCAGTTCT 650  
  
55 GCAGCGGCTCTGGCCG [ATACTACGACGGTAAATGGT] GGGGCCGTTCACTT104  
|||||  
651ACAGCGGCTCTGGCCG CTGCCACGACGGTTAATGGT GGGACCGTTCACTT700  
  
105 TAAAGGGGAAGTTGTTAACGCCGCTTGCGCAGTTGATGCAGGCTCTGTTG 154  
|||||  
701 TAAAGGGGAAGTTGTTAACGCCGCTTGCGCAGTTGATGCAGGCTCTGTTG 750  
  
155 ATCAAACCGTTCAGTTAGGCCAGGTTCTGACCGCTAGCCTGAAGCAGGAA 204  
|||||  
751 ATCAAACCGTTCAGTTAGGACAGGTTCTGACCGCATCGCTGGCACAGGAA 800  
  
205 GGAGCAACCAGCTCTGCCGTTGGTTTAAACATTCAAGTGAATGATTGCGA 254  
|||||  
801 GGAGCAACCAGTTCGTCTGTCTGGTTTAAACATTCAAGTGAATGATTGCGA 850  
  
255 TACCACTGTTGCCACAAAAGCTGCTGTTGCCTTCTTAGGTACGGCAATTG 304  
|||||  
851 TACCAATGTTGCATCTAAAGCCGCTGTTGCCTTTTATAGGTACGGCGATTG 900  
  
305 [ATGCTACCGATACTGATGTA] CTGGCTCTGCAGAGTTCAGCTGCGGGTAGC354  
|||||  
901 ATGCGGGTCATACCAACGTT CTGGCTCTGCAGAGTTCAGCTGCGGGTAGC950  
  
355 GCAACAAACGTTGGTGTGCAGATCCTGGACAGAACGGGTGCTGCGCTGGC 404  
|||||  
951 GCAACAAACGTTGGTGTGCAGATCCTGGACAGAACGGGTGCTGCGCTGAC 1000  
  
405 GCTGGACGGTGCACATTTAGTTTCAGAAACAACCCTGAATAACGGAACCA 454  
|||||  
1001 GCTGGATGGTGCACATTTAGTTTCAGAAACAACCCTGAATAACGGAACCA 1050  
  
455 ACACCATTCGGTTCCAGGCGCGTTATTTTGAACCGGTGCGCAACCCCG 504  
|||||  
1051 ATACCATTCGGTTCCAGGCGCGTTATTTTG...CCGGGGCCGCAACCCCG 1097  
  
505 GGTGCTGCTAATGCGGATGCGACCTTCAAGGTTCAAGTATCAATAA.... 549  
|||||  
1098 GGTGCTGCTAATGCGGATGCGACCTTCAAGGTTCAAGTATCAATAACCTAC 1157

Abb. 1 / 2

DSM 1-atgaagttaaaattcatctccatggctgtattttcagctctgaccctggg 50  
6601 |||||  
AD 110 1 atgaagttaaaattcatctccatggctgtattttcagctctgaccctggg 50

51 tgttgcgacaaatgcgtctgctgtca[ccacggtaggtgtggtacag]ttc 100  
|||||  
51 tgttgcgacaaatgcgtctgctgtca ccacggttaatggtggtacag ttc 100

101 attttaagggtgaagtggtaaatgctgcatgtgctgtaaacactaactca 150  
|||||  
101 attttaagggtgaagtggtaaatgctgcatgtgctgtaaacactaactca 150

151 ttcgatcagacggttaatccttgacaggttcggtccgaaagattgaaagt 200  
|||||  
151 ttcgatcagacggttaatccttgacaggttcggtccgaaagattgaaagt 200

201 agatggagctaaaagcaatccagttggatttacaattgaattaaatgatt 250  
|||||  
201 agatggagctaaaagcaatccagttggatttacaattgaattaaatgatt 250

251 gtgactcgcaggtgtctgctggtgcaggaattgtcttttcaggcccagca 300  
|||||  
251 gtgactcgcaggtgtctgctggtgcaggaattgtcttttcaggcccagca 300

301 gttactggtaaaacagatgttcttgctttacaaagtctcgcagcgggttc 350  
|||||  
301 gttactggtaaaacagatgttcttgctttacaaagtctcgcagcgggttc 350

351 tgcaacaaacttcggcgttcagattactgaccataggccgaaggttgtag 400  
|||||  
351 tgcaacaaacttcggcgttcagattactgaccataggccgaaggttgtag 400

401 ctttagatggaactgcaagctcaacgtttacattaactgacggaaccaac 450  
|||||  
401 ctttagatggaactgcaagctcaacgtttacattaactgacggaaccaac 450

451 aaaattccatttcaggcggtttactacgcaactggacaggccactgc [tgg500  
|||||  
451 aaaattccatttcaggcggtttactacgcaactggacaggccactgc tgg500

501 tattgccaacgccgacg]ccacctttaagttcagtagcagtaa 543  
|||||  
501 tattgccaacgccgacg ccacctttaagttcagtagcagtaa 543

Abb. 2 / 2



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No

PCT/EP 98/07397

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12Q1/68 C12N15/70

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12Q C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	VAN DIE I ET AL.: "Type 1C fimbriae of a uropathogenic Escherichia coli strain: cloning and characterization of the genes involved in the expression of the 1C antigen and nucleotide sequence of the subunit gene" GENE, vol. 34, 1984, pages 187-196, XP002097256 see abstract see page 188, column 1, paragraph 2 - column 2, paragraph 2	1,3
Y	see page 191, column 2, paragraph 2 - page 192, column 1, paragraph 1 --- -/--	4,5

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 March 1999

Date of mailing of the international search report

07/04/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Knehr, M

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 98/07397

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SEKIZAKI T ET AL.: "DNA sequence of type 1 fimbrin, fpull, gene from a chicken pathogenic Escherichia coli serotype 078" JOURNAL OF VETERINARY MEDICAL SCIENCE, vol. 55, 1993, pages 395-400, XP002097257 see abstract	2
Y	KRUIS W ET AL.: "Use of probiotic substances in human medicine - current clinical studies with the apathogenic Escherichia coli strain Nissle 1917" MEDIZINISCHE WELT, vol. 47, no. 6, 1996, pages A53-A57, XP002097258 see the whole document	3,4
Y	BLUM ET AL: "Properties of Escherichia coli strains of serotype 06" PLASMID, vol. 23, no. 4, July 1995, pages 234-236, XP002085750 see the whole document	3-5
P,X	GEORG K J AND SCHLORER E: "Probiotische Therapie einer pseudomembranösen Klitis. Kombination aus intestinaler Lavage und oraler Gabe von Escherichia coli" DEUTSCHE MEDIZINISCHE WOCHENSCHRIFT, vol. 123, no. 43, 1998, pages 1274-1278, XP002097259 see the whole document	3,4
P,Y	see the whole document	1,2,5
P,Y	WO 98 44134 A (BLUM OEHLER GABRIELLE ; SONNENBORN ULRICH (DE); PROPERT HANS (DE);) 8 October 1998 see the whole document	1,2,5

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

Internal Application No.

PCT/EP 98/07397

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9844134 A	08-10-1998	DE 19713543 A	08-10-1998
		AU 7209598 A	22-10-1998
-----			

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/07397

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 6 C1201/68 C12N15/70

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12Q C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

### C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	VAN DIE I ET AL.: "Type 1C fimbriae of a uropathogenic Escherichia coli strain: cloning and characterization of the genes involved in the expression of the 1C antigen and nucleotide sequence of the subunit gene" GENE, Bd. 34, 1984, Seiten 187-196, XP002097256 siehe Zusammenfassung siehe Seite 188, Spalte 1, Absatz 2 - Spalte 2, Absatz 2	1,3
Y	siehe Seite 191, Spalte 2, Absatz 2 - Seite 192, Spalte 1, Absatz 1 --- -/--	4,5



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



**Siehe Anhang Patentfamilie**

<sup>2</sup> Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie auszuführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie anzuzeigen ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

**"Y"** Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindertischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

19. März 1999

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

07/04/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Knehr, M

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter. nales Aktenzeichen

PCT/EP 98/07397

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	SEKIZAKI T ET AL.: "DNA sequence of type 1 fimbrin, fpull, gene from a chicken pathogenic Escherichia coli serotype 078" JOURNAL OF VETERINARY MEDICAL SCIENCE, Bd. 55, 1993, Seiten 395-400, XP002097257 siehe Zusammenfassung ---	2
Y	KRUIS W ET AL.: "Use of probiotic substances in human medicine - current clinical studies with the apathogenic Escherichia coli strain Nissle 1917" MEDIZINISCHE WELT, Bd. 47, Nr. 6, 1996, Seiten A53-A57, XP002097258 siehe das ganze Dokument ---	3,4
Y	BLUM ET AL: "Properties of Escherichia coli strains of serotype 06" PLASMID, Bd. 23, Nr. 4, Juli 1995, Seiten 234-236, XP002085750 siehe das ganze Dokument ---	3-5
P,X	GEORG K J AND SCHLORER E: "Probiotische Therapie einer pseudomembranösen Klitis. Kombination aus intestinaler Lavage und oraler Gabe von Escherichia coli" DEUTSCHE MEDIZINISCHE WOCHENSCHRIFT, Bd. 123, Nr. 43, 1998, Seiten 1274-1278, XP002097259 siehe das ganze Dokument ---	3,4
P,Y	---	1,2,5
P,Y	WO 98 44134 A (BLUM OEHLER GABRIELLE ;SONNENBORN ULRICH (DE); PROPERT HANS (DE);) 8. Oktober 1998 siehe das ganze Dokument -----	1,2,5

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/07397

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9844134 A	08-10-1998	DE 19713543 A AU 7209598 A	08-10-1998 22-10-1998
-----			